

# ANALISIS VARIASI GENETIK *Anopheles subpictus* (DIPTERA: CULICIDAE) DI SEKITAR YOGYAKARTA DENGAN RAPD-PCR

*Analysis on Genetic Variations of Anopheles subpictus (Diptera: Culicidae) using RAPD-PCR in the Vicinity of Yogyakarta*

Utari Cr. S.<sup>1</sup>, Sudjadi F.A.<sup>2</sup>, dan Artama W.T.<sup>3</sup>

Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar dan Biomedis  
Program Pascasarjana Universitas Gadjah Mada

## ABSTRACT

Up to present time, malaria still constitutes a major health problem in Indonesia, including in Java or outside the island. The presence of unidentified sibling (or closely related) species complex may result in difficulties or failure of the disease control program. The members of sibling species complex may possess different properties as phenotypical expressions of genetic variations owned by the reproductively isolated populations. This research was carried out primarily to investigate the genetic variations of *An. subpictus*, mosquitos known as one of the main vector of malaria in Java, and to identify whether the genetic variations had become inter-specific.

*An. subpictus* mosquito samples were collected using aspirator from different environment areas around Yogyakarta, i.e. coastal of Congot and Sanden, in Kulonprogo and Bantul regency, respectively, and inland hilly areas of Salaman with altitude of 300 m above sea level, and higher Sawangan with altitude of 700 m in Magelang regency. To investigate the genetic variations of mosquitos, RAPD-PCR method was adopted using oligo-nucleotide (10 base) random primers. This research included field and laboratory works: Anopheline mosquitos were collected, identified and sorted morphologically by their species. The DNA of *An. subpictus* mosquitos were isolated (to be extracted, precipitated and washed), subsequently amplified using thermocycler (denaturated at 94°C; annealing at 35°C; and extension at 72°C). It was then visualized by electrophoresis using gel agarose 1.2% with an addition of 15 µl ethidium bromide. DNA bands were observed under UV and photographed by polaroid film 667.

As results, bright or consistent bands were available from RAPD reactions using the following suitable primers: F2, F4, F6, P4 and P5. This genetic marker proved to be an effective means for identifying multiple bands of mosquito samples that were unique to and fixed to different species, members of *An. subpictus* complexes. As seen in the

1) Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret Surakarta

2) Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada Yogyakarta

3) Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada Yogyakarta

following indications, unique DNA bands for *An. subpictus* were produced by F2 primer at 360 bp, as well as F6 primer at 455 bp. Unique bands to Sawangan samples of *An. subpictus* were recorded from the use of F6 primer at 679 bp. Another unique bands of Sawangan samples were also recorded from the primers of P4 at 216 bp.

Quantitative analysis on available bands (using primers of F6, P4, and P5) were showing reproductively isolation as different species between Sawangan samples of *An. subpictus* mosquitos with samples from other OTU with percentage difference more than 50%. By these all findings, however, further studies were needed, not only to support the presence of different full (sibling) species, but to describe all other species properties, as well.

**Keywords:** *Anopheles subpictus* – coastal – inland hilly – genetic variation – reproductive isolation – sibling species – RAPD-PCR.

## PENGANTAR

Malaria merupakan salah satu penyakit yang sampai saat ini masih merupakan masalah kesehatan masyarakat di Indonesia, baik di Jawa maupun di luar Jawa. Penyakit tersebut dapat menyebabkan kematian secara langsung. Angka kesakitan malaria juga masih cukup tinggi, terutama di luar Jawa dan Bali. Di daerah transmigrasi masih sering terjadi letusan atau wabah yang menimbulkan banyak korban jiwa (Dep Kes RI, 1983; Hoedoyo, 1992; Kirnowardoyo, 1985). Kejadian tersebut disebabkan karena penduduk transmigran berasal dari daerah non endemik dan belum memiliki kekebalan cukup, sehingga mudah terinfeksi. Beberapa kejadian luar biasa dilaporkan oleh Laihad (1998) baik di Jawa maupun di luar Jawa, juga peningkatan kasus dilaporkan terjadi di banyak tempat, di antaranya di Kokap, Purworejo, Cilacap, Jember dan Tasikmalaya.

Program pengendalian malaria seringkali menemui kegagalan antara lain karena kurangnya data mengenai vektor yang menularkan, termasuk kemungkinan keberadaan kompleks spesies sibling yang morfologi. *Anopheles subpictus* Grassi dikenal sebagai salah satu vektor malaria utama di Jawa di samping *An. sundaicus*, *An. aconitus* dan *An. maculatus*. Keempat vektor utama memiliki *adaptive zone/niche* ekologi masing-masing. Keberadaan kompleks spesies sibling dengan sifat-sifatnya yang berbeda-beda, meskipun secara morfologis sulit dibedakan, akan menyulitkan program pengendalian. Sehubungan dengan kemungkinan sebagai spesies (sibling) kompleks tersebut, sifat penting yang menarik perhatian pada nyamuk *An. subpictus* yaitu habitatnya

yang sangat bervariasi, bahkan di antaranya dapat ditemukan (1) di daerah pantai dengan air payau sebagai tempat perindukannya, dan (2) di daratan meluas sampai jauh dari pantai bahkan dapat dijumpai di daerah ketinggian di pegunungan (*inland hilly areas*) dengan air tawar sebagai tempat perindukannya. Perbedaan mendasar mengenai habitat pada populasi *An. subpictus* tersebut menimbulkan dugaan telah terjadi isolasi spasial yang pada akhirnya menimbulkan isolasi reproduksi. Aliran genetik *An. subpictus* antara populasi daerah pantai dengan populasi di daratan kemungkinan telah tidak terjadi, dengan demikian diharapkan populasi di pantai mempunyai lebih banyak perbedaan variasi genetik dengan populasi di daratan, sebagai akibat dari telah terjadinya reorganisasi genetik pada masing-masing populasi. Dengan alasan tersebut di atas, dalam penelitian ini dilakukan pemeriksaan molekuler untuk mengetahui perbedaan variasi genetik di antara populasi *An. subpictus* dari OTU (*Operational Taxonomic Unit*) Sawangan, Salaman, Sanden dan Congot. Kajian molekuler juga dilakukan untuk mengetahui sifat variasi genetik, apakah telah menjadi interspesifik dan telah membentuk spesies tersendiri (terpisah).

## CARA PENELITIAN

Untuk kajian infraspesifik nyamuk *An. subpictus*, dilakukan penelitian molekuler menggunakan penanda genetik RAPD-PCR. Sampel nyamuk diambil dari beberapa daerah dengan lingkungan ekologis yang berbeda di sekitar Yogyakarta, antara lain Sanden, pantai yang berawa; Congot, pantai dengan laguna; Salaman, daratan dengan ketinggian sekitar 300 m; dan Sawangan, daerah pegunungan dengan ketinggian sekitar 700 m dari permukaan laut.

Dalam penelitian ini dibedakan pekerjaan lapangan dalam kerangka pengumpulan sampel dan pekerjaan laboratorium untuk pemeriksaan sampel nyamuk. Pekerjaan lapangan meliputi penangkapan nyamuk *Anopheles* di malam hari, sekitar pukul 20.00 - 24.00, menggunakan aspirator manual di OTU Sawangan, Salaman, Sanden dan Congot. Nyamuk dari lapangan dikumpulkan dalam cup khusus, dan disimpan dalam kotak khusus. Nyamuk dijaga tetap hidup sampai di laboratorium. Pekerjaan di laboratorium, meliputi identifikasi morfologi, pemeriksaan RAPD-PCR (isolasi DNA, amplifikasi DNA dan elektroforesis).

Nyamuk *An. subpictus* yang telah teridentifikasi disortir, kemudian dimasukkan ke dalam alkohol 70% dan disimpan dalam freezer (Post, 1985), untuk selanjutnya siap dilakukan pemeriksaan molekuler. Isolasi

DNA menggunakan prosedur dari Hoelzel (1992), yaitu metode CTAB (*Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide*), dengan modifikasi penambahan proteinase K ke dalam larutan Bufer lisis. Sodium asetat diganti dengan amonium asetat dan volume larutan bufer lisis diganti dari 500 µl menjadi 100 µl.

Isolasi DNA dilakukan pertama-tama secara mekanis, diikuti dengan cara kimiawi. Cara mekanis meliputi penggerusan dengan pellet pestle sampai nyamuk hancur, sedangkan cara kimiawi menggunakan enzim proteinase K dan beberapa zat kimia lain untuk ekstraksi, presipitasi dan pencucian. Proteinase K berperan menguraikan protein dan melepaskan asam nukleat ke dalam larutan lisis sel. Meskipun menurut Kambhampati *et al.* (1992) DNA dapat diperoleh hanya dengan isolasi dari satu kaki nyamuk saja, tetapi dalam penelitian ini digunakan satu (utuh) nyamuk betina agar diperoleh DNA lebih banyak; dengan demikian dapat digunakan untuk reaksi dengan beberapa primer dengan beberapa kali ulangan.

Isolasi DNA nyamuk dimulai dengan memanaskan larutan Bufer lisis CTAB terlebih dahulu dalam water bath 60°C selama 10 menit. Satu nyamuk dimasukkan ke dalam ependorf, 100 µl bufer lisis CTAB yang telah dipanaskan ditambahkan, selanjutnya nyamuk digerus dengan pestle sampai hancur. Selanjutnya ke dalam masing-masing ependorf ditambahkan 1 µl 2 mercaptoetanol, sampel *divortex* sampai homogen, kemudian ditambahkan 10 µl proteinase K dan *divortex* lagi. Setelah itu, tabung diinkubasi selama 2 jam pada suhu 60°C. Sesudah inkubasi, ke dalam masing-masing tabung ditambahkan 200 µl TE (50 mM Tris/10 mM EDTA), 200 µl phenol dan 200 µl CIAA. Sample *divortex* lalu disentrifuse dengan kecepatan 13.000 rpm selama 5 menit. Penambahan 200 µl CIAA diulang, *divortex* lagi dan disentrifuge dengan kecepatan dan waktu yang sama. Lapisan atas dari larutan dipindahkan ke dalam tabung ependorf yang baru, kemudian dilakukan presipitasi untuk mengendapkan asam nukleat. Tahap ini dimulai dengan penambahan isopropanol dingin 2/3 volume atau lebih kurang 1 µl. Sampel diinkubasi (dipresipitasi) pada suhu -70°C selama 1 jam, kemudian disentrifuge lagi dengan kecepatan 13.000 rpm selama 5-10 menit. Isopropanolnya dibuang dengan hati-hati, lalu ditambahkan 200 µl E (50 mM Tris/10 mM EDTA pH 8), 20 (1 Amonium asetat dan 500 µl etanol absolut. Etanol absolut pada tahap ini berperan memindahkan residu pelarut organik. Sampel tersebut selanjutnya dipresipitasi pada suhu -70°C selama 1/2-1 jam lalu disentrifuge dengan kecepatan 13.000 rpm selama 5 menit. Supernatan dibuang, selanjutnya pelet dicuci dengan 500 µl etanol dingin 70%, kemudian disentrifuse dengan kecepatan 13.000 rpm selama 5 menit. Supernatan dibuang, pelet dikering-

kan selama 15 menit, lalu dilarutkan dalam 50 µl TE (10 mM Tris/1mM EDTA). DNA disimpan pada suhu -20°C, selanjutnya siap untuk dilakukan PCR.

DNA nyamuk hasil isolasi selanjutnya diamplifikasi menggunakan primer A, B, D, E, F, dan P dari teknologi Operon. Reaksi PCR hasil optimasi terdiri dari 0,2 µl dNTP, 0,2 µl enzim *Taq* DNA Polimerase, 2,5 (1 bufer PCR 10X, 2,5 (1 MgCl<sub>2</sub> 25 mM, 2 µl primer, 4-6 (1 DNA dan 13,6-11,6 µl dH<sub>2</sub>O. Pada tahap pertama sebelum amplifikasi, dilakukan pemilihan primer dari 18 primer yang tersedia terhadap satu macam DNA dari salah satu lokasi penelitian, tujuannya untuk memperoleh primer yang cocok dan menghasilkan pita-pita DNA yang jelas/konsisten. Primer terpilih (F2, F4, F6, P4 dan P5) selanjutnya digunakan secara tetap pada semua sampel dari semua OTU. Semua komponen DNA dibuat dalam bentuk aliquot untuk menghindari kontaminasi; satu aliquot untuk lima kali reaksi. Total volume reaksi PCR adalah 25 µl. Sebelum tabung ependorf yang berisi komponen-komponen PCR dimasukkan ke dalam thermocycle, terlebih dahulu ditambahkan 25 µl mineral oil, untuk menghindari evaporasi. Profile temperatur PCR sebagai berikut: denaturasi awal pada suhu 94°C selama 4 menit, denaturasi siklus 94°C selama 1 menit, annealing pada suhu 35°C selama 1 menit, polimerisasi pada suhu 72°C selama 2 menit dan polimerisasi akhir pada suhu 72°C selama 5 menit. Total siklus yang dikerjakan 45 siklus. Tabung ditempatkan pada suhu 4°C semalam.

Hasil amplifikasi DNA selanjutnya dipisah-pisahkan berdasarkan pasangan basanya menggunakan 0,6 gram gel agarose elektroforesis dalam 50 ml bufer TAE 1 x (mengikuti Sambrook *et al.*, 1989). Untuk pewarnaan ditambahkan 15 µl etidium bromide pada gel agarose, lalu dituang ke dalam elektroforesis yang sudah ada sisirnya. Apabila gel telah mengeras, sisir diambil, lalu dituangi lebih kurang 200 ml TAE 1 x. Sampel DNA teramplifikasi diberi 2 µl *blue juice* dengan komposisi 5:2 (DNA:blue juice) kemudian dihomogenkan dengan cara memipet beberapa kali. Sampel selanjutnya dimasukkan ke dalam sumuran gel elektroforesis, sebagai molekul standar digunakan marker 1 kb *ladder*. Elektroforesis dijalankan dengan beda potensial 50 volt selama 2,5 jam. Pengamatan pita DNA dilakukan di bawah sinar UV. Pita DNA ini harus segera difoto dengan film Polaroid 667 dan segera digambar pada plastik transparan sebelum menghilang. Penggambaran pita DNA pada plastik transparan bertujuan untuk memudahkan analisis, oleh karena itu pengukuran migrasi pita-pita hasil amplifikasi tidak dilakukan langsung pada gel, tetapi pada plastik transparan.

Analisis dilakukan pada hasil foto dan hasil plot pada plastik

transparan, baik kualitatif maupun kuantitatif. Secara kualitatif analisis meliputi pembacaan pita DNA yang unik/spesifik untuk spesies serta pembacaan semua pita DNA yang teramplifikasi. Analisis data secara kuantitatif menggunakan program NTSys-PC. Pita DNA yang terbentuk dari hasil amplifikasi diskor berdasarkan ada/tidaknya pita DNA. Pita DNA yang muncul diberi nilai 1, sedangkan yang tidak diberi nilai 0. Molekul DNA hasil amplifikasi dihitung pasangan basanya dengan berpedoman pada jauhnya migrasi DNA standar, dalam hal ini DNA standar yang dipakai adalah DNA 1 kb ladder. Koefisien kesamaan antara pasangan objek yang diperbandingkan ditentukan dengan koefisien kesamaan Simple Matching. Berdasarkan koefisien kesamaan tersebut dibuat dendrogram dengan metode UPGMA (*Unweighted Pair Group Method With Arithmetic Averages*).

Berdasarkan pada ada/tidaknya pita, disusun matriks data biner, kemudian diturunkan menjadi matriks persamaan/matriks jarak. Selanjutnya digunakan rumus Nei & Li (1979) cit Tasliah (1999) untuk menentukan kesamaan pasangan genotipe pada individu yang berbeda, yaitu:

$$F = 2nab / (na + nb) \quad (1)$$

F: Koefisien persamaan

nab: jumlah pita yang sama posisinya pada individu a dan individu b  
na & nb: jumlah pita pada masing-masing individu a dan individu b.

Pada program NTSys-PC, data matriks dihitung melalui koefisien Dice yang pada prinsipnya sama dengan rumus Nei & Li tersebut, yaitu:

$$S_b = 2a / n_1 + n_2 \quad (2)$$

a: jumlah pita yang sama posisinya pada individu yang dibandingkan  
n1 & n2: jumlah pita pada masing-masing individu yang dibandingkan.

Untuk menghitung koefisien jarak, data dikonversikan dengan rumus:

$$D = 1 - S \quad (3)$$

D: jarak

S: nilai matriks persamaan yang dihitung dengan rumus Nei & Li

Setelah diperoleh koefisien jarak untuk seluruh perbandingan individu, lalu disusun matriks jarak. Dari sini dilakukan analisis kluster secara manual, sampai akhirnya terbentuk diagram pohon. Pengolahan data menggunakan program yang terdapat didalam komputer.

Pita DNA yang selalu hadir pada semua sampel nyamuk yang dibandingkan disebut dengan pita DNA

yang hanya hadir pada beberapa sampel sebagai pita DNA yang polimorfisme. Penghitungannya dilakukan dengan membandingkan pita DNA yang selalu hadir pada semua sampel yang berasal dari keempat daerah penelitian dan membandingkan pita-pita DNA yang hadir pada masing-masing daerah penelitian, kemudian dihitung persentasenya. Perhitungan dilakukan untuk masing-masing primer (5 primer). Variabel yang diukur adalah jumlah total pita DNA yang monomorfisme dan polimorfisme, serta jumlah semua pita DNA.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Dari kajian vektor malaria ini dapat ditemukan populasi *An. subpictus* sensu stricto dari OTU Sawangan, yang menunjukkan keterpisahan reproduksi dengan *An. subpictus* sensu lato dari populasi lain, terutama dari OTU daerah pantai Sanden dan Congot. Keterpisahan reproduksi itu terlihat dari hasil pemeriksaan RAPD-PCR baik kualitatif maupun kuantitatif.

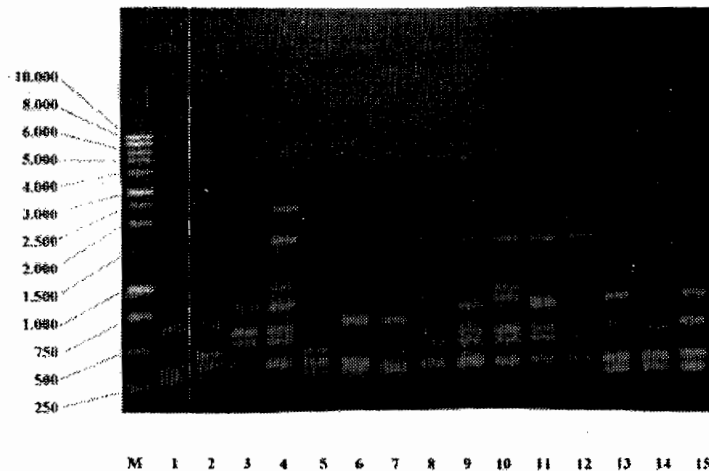
Untuk tujuan analisis produk amplifikasi DNA *An. subpictus* dari masing-masing OTU menggunakan kelima primer yang sesuai seperti diuraikan di atas, berikut disajikan pita-pita DNA yang muncul dan dapat dianalisis dari hasil elektroforesis (Gambar 1-5). Taxon *An. subpictus* pertama-tama ditentukan berdasarkan pita-pita DNA hasil amplifikasi yang berkaitan satu sama lain, seperti terlihat pada Gambar 1-5. Pita-pita DNA yang muncul itu secara garis besar dapat dibedakan: (1) pita-pita yang jelas, kontras dengan latar belakangnya. Latar belakang demikian juga terdiri dari (2) pita-pita lain yang lebih samar-samar, terutama apabila dilihat sendiri-sendiri.

Dalam penelitian ini, jumlah pita DNA yang teramplifikasi terlihat berbeda untuk tiap-tiap primer; ini disebabkan karena urutan nukleotida pada masing-masing primer berbeda. Seperti diutarakan oleh Grossberg *et al.* (1996), jumlah segmen yang diamplifikasi oleh suatu primer tergantung pada daerah tempat perlekatan primer pada sepanjang genom. Pita dengan ukuran fragmen dalam pasangan basa tertentu yang tidak selalu ada pada seluruh individu dikenal sebagai polimorfisme, sebaliknya fragmen yang selalu ada pada semua individu sebagai monomorfisme. Terakhir cenderung lebih banyak dijumpai pada populasi kecil dengan individu-individu yang memiliki kecenderungan in-breeding seperti pada koloni laboratorik pada nyamuk.

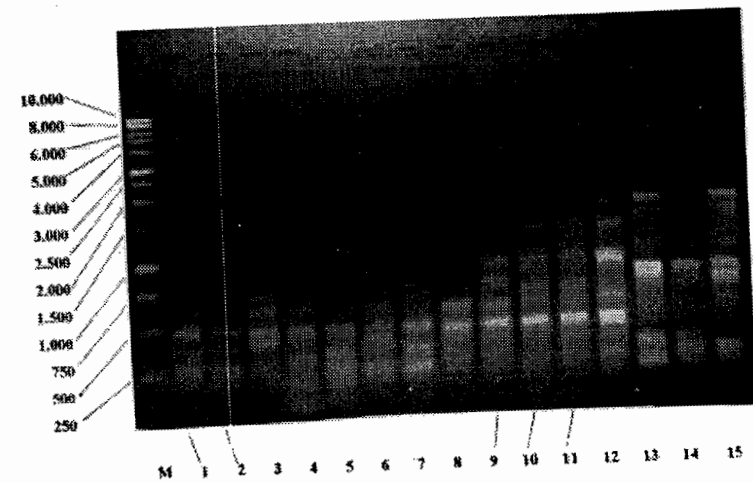
Identifikasi nyamuk mana yang termasuk dalam spesies penuh yang berbeda, artinya yang secara reproduksi telah terpisah menurut

yang unik/spesifik yang tampak pada segmen dengan ukuran base pair tertentu, setidaknya berasal dari satu primer, apalagi apabila dijumpai lebih dari satu primer. Pita-pita unik pada fragmen dengan ukuran tertentu tersebut selalu muncul bersama pada individu-individu yang termasuk dalam spesies yang sama, sebaliknya tidak pada spesies yang berbeda. Ciri unik pada pita DNA tidak terlepas dari isolasi reproduktif individu-individu. Apabila reaksi RAPD-PCR secara teratur memproduksi pita-pita khas untuk spesies tertentu, sebagai profil diagnostik, maka keanggotaan suatu spesies dapat ditentukan karena sama-sama mempunyai pita unik tersebut. Hasil penghitungan ukuran fragmen DNA dalam base pair dapat dilihat pada bagian kiri Tabel 1-3. Makin jauh migrasi DNA pada gel makin kecil  $M$  (=Berat Molekul) DNA-nya, dan sebaliknya.

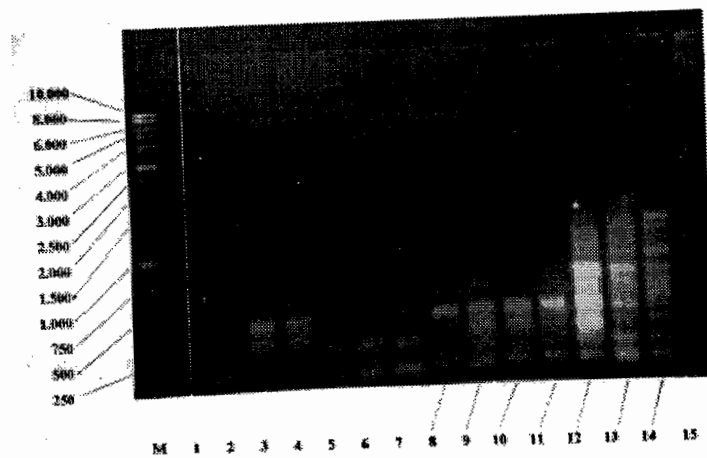
Analisis pita DNA genom *An. subpictus* (Gambar 1-5) hasil amplifikasi, dapat dilakukan dengan dua cara. Pertama secara kualitatif dengan analisis pita yang unik, spesifik. Pita-pita DNA dengan base pair tertentu yang hanya dimiliki oleh individu anggota spesies tertentu merupakan pita yang spesifik. Pita-pita yang khas ini dapat digunakan untuk profil diagnostik biasa, seperti kunci identifikasi spesies lainnya pada taksonomi klasik; dengan demikian dapat digunakan untuk identifikasi spesies (Hadrys *et al.*, 1992). Cara kedua, analisis kuantitatif dengan melihat semua pita DNA hasil amplifikasi, tanpa memperhatikan apakah unik atau tidak. Berdasarkan ada tidaknya pita DNA tersebut, fragmen yang dapat teramplifikasi diberi nilai 1, sedangkan yang tidak beri nilai 0. Analisis kuantitatif ini lebih lanjut diuraikan di belakang.



Gambar 1. elektroferogram dengan primer F2. M= Marker, kolom 1-3 sampel Salaman, 4-6 Congot, 7-9 Sanden, 10-12 Sawangan dan 13-15 Jangkaran.



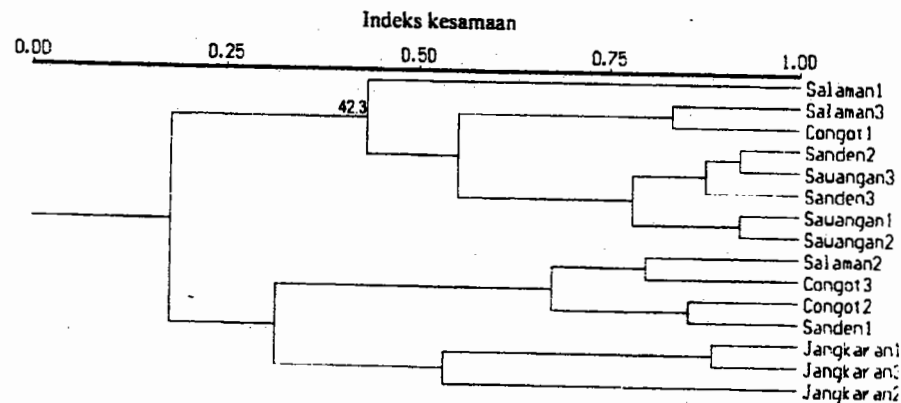
Gambar 2. Elektroferogram dengan primer F6. M= Marker, kolom 1-3 sampel dari Salaman, 4-6 Congot, 7-9 Sanden, 10-12 Sawangan dan 13-15 Jangkaran.



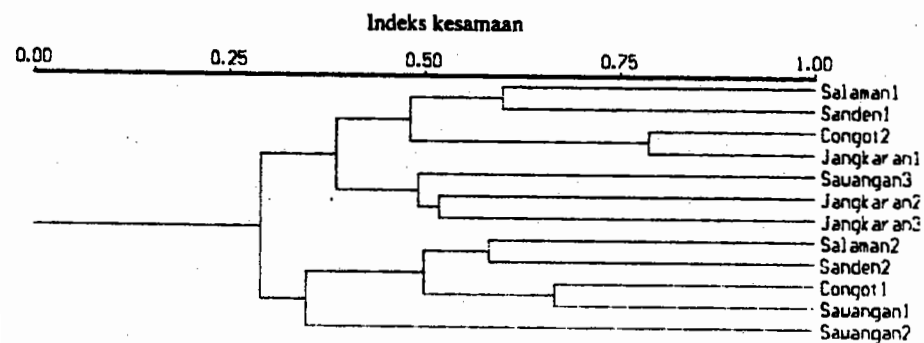
Gambar 3. Elektroferogram dengan primer P4. M= Marker, kolom 1-3 sampel dari Salaman, 4-6 Congot, 7-9 Sanden, 10-12 Sawangan dan 13-15 Jangkaran.

Untuk mempermudah analisis, dalam pemeriksaan molekuler ini juga digunakan sampel pembanding dari spesies yang morfologik telah diketahui berbeda yaitu *An. sudaicus* dari Jangkaran. Maksudnya, agar dapat diperlihatkan perbedaan genetik khas berupa pola pita-pita DNA yang menunjukkan spesies berbeda, *An. subpictus* dan *An. sudaicus*. Dalam pemeriksaan RAPD, *An. sudaicus* diperlakukan dengan cara yang sama dengan *An. subpictus* dari berbagai OTU daerah yang diteliti.





Gambar 4. Dendrogram produk amplifikasi DNA nyamuk menggunakan primer F2, menunjukkan indeks kesamaan genetik sampel dari OTU yang berbeda



Gambar 5. Dendrogram produk amplifikasi DNA nyamuk menggunakan primer P5, menunjukkan indeks kesamaan genetik sampel dari OTU yang berbeda

Pada elektroferogram dapat dilihat bahwa dari masing-masing primer (F2, F4, F6, P4, P5) yang dipakai dapat dihasilkan pita-pita DNA dengan ukuran yang berbeda-beda, sesuai dengan BM-nya. Kualitatif, kelima primer tersebut dapat menghasilkan pita-pita DNA yang unik untuk masing-masing *An.sundaicus*, *An. subpictus*, untuk keduanya, atau tidak menghasilkan pita-pita DNA yang unik (Gambar 1-5, Tabel 1-3).

Pada elektroferogram dengan primer F2 dihasilkan 19 macam pita DNA hasil amplifikasi dengan ukuran fragmen berkisar antara 319 bp.-2704 bp. Ditemukan pita-pita unik untuk *An. sundaicus* pada fragmen DNA berukuran 417 bp. Gambar 1, Tabel 1 juga menampilkan pita DNA unik berukuran 360 bp yang dapat ditemukan pada semua individu *An. subpictus*.

maupun Sawangan, sedangkan pada individu-individu dari OTU Jangkaran tidak. Dengan demikian, primer F2 dapat digunakan untuk deferensiasi antara keduanya: baik *An. subpictus* dari *An. sundaicus* ataupun sebaliknya, sebagai spesies yang berbeda. Pita DNA yang unik karena hanya dijumpai pada *An. sundaicus*, atau sebaliknya pita yang hanya dijumpai pada *An. subpictus*, jelas menunjukkan ketiadaan aliran genetik antara keduanya, atau menunjukkan keterpisahan reproduktif antar kedua populasi yang berbeda spesies.

Tabel 1. Hasil interpretasi fragmen DNA berdasarkan ada atau tidaknya pita-pita DNA yang diamplifikasi dengan primer F2.

No.	Ukuran Fragmen DNA(bp)	Daerah Asal Nyamuk														
		Salaman			Congot			Sanden			Sawangan			Jangkar an		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	2704	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	1936	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	1811	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0
4	1694	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
5	1297	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
6	993	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0
7	929	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1
8	869	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
9	813	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0
10	665	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1
11	622	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0
12	544	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13	509	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0
14	476	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15	446	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16	417	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
17	360	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
18	365	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1
19	319	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Amplifikasi DNA dengan primer F4 menghasilkan 21 macam pita dengan panjang fragmen bervariasi antara 248 bp.- 2231 bp., tidak ditemukan pita-pita yang unik oleh karena itu secara kualitatif primer

F4 tidak potensial untuk identifikasi/deferensiasi baik *An. subpictus* maupun *An. sundaicus*.

Tabel 2. Hasil interpretasi fragmen DNA berdasarkan ada atau tidaknya pita-pita DNA yang diamplifikasi dengan primer F2.

No.	Ukuran Fragmen DNA(bp)	O T U														
		Salaman			Congot			Sanden			Sawangan			Jangkar		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	1977	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
2	1730	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0
3	1618	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
4	1416	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0
5	1324	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	1159	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	948	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0
8	887	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0
9	830	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1
10	776	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
11	726	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1
12	679	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0
13	635	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14	594	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0
15	556	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
16	520	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
17	455	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
18	372	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
19	348	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0
20	326	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
21	305	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1
22	267	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
23	249	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
24	233	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabel 3. Hasil interpretasi fragmen DNA berdasarkan ada atau tidaknya pita-pita DNA yang diamplifikasi dengan primer P4

No.	Ukuran Fragmen DNA(bp)	O T U														
		Salaman			Congot			Sanden			Sawangan			Jangkar		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	1569	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
2	1287	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1
3	1127	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
4	1055	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
5	988	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
6	925	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	810	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1
8	758	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
9	664	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1
10	582	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1
11	545	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0
12	477	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
13	447	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
14	418	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0
15	392	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
16	343	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0
17	321	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
18	281	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0
19	263	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20	247	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
21	231	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
22	216	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0
23	202	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1
24	189	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
25	177	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Bukti berupa pita-pita DNA yang unik pada *An. subpictus* OTU Sawangan dapat ditunjukkan pada penggunaan primer F6, pada fragmen DNA ukuran 679 bp. Primer tersebut menghasilkan pita-pita DNA 24 macam, dengan panjang fragmen berkisar 233 bp-1977 bp.

Keberadaan pita DNA unik tersebut merupakan bukti bahwa individu nyamuk yang berasal dari Sawangan merupakan spesies yang berbeda. Dengan demikian primer F6 ini dapat untuk identifikasi spesies dari nyamuk *An. subpictus*. Pada Gambar 3 dan Tabel 3 juga dapat dijumpai pita DNA yang selalu hadir pada semua lokasi kecuali OTU Jangkaran (*An. sundaicus*); pita DNA tersebut berukuran 455 bp., dengan demikian primer F6 juga dapat digunakan untuk deferensiasi nyamuk *An. subpictus* dari *An. sundaicus*.

Amplifikasi DNA menggunakan primer P4 pada elektroferogram menghasilkan 21 pita DNA dengan ukuran berkisar 177 bp-1569 bp. Pada Tabel 3 ini juga dijumpai pita DNA yang unik untuk nyamuk *An. subpictus* dari OTU Sawangan, yaitu fragmen yang berukuran 216 bp. Pita DNA ini hanya dijumpai pada semua individu yang berasal dari OTU Sawangan. Dengan demikian telah 2 primer yang secara kualitatif memberikan bukti bahwa nyamuk dari OTU Sawangan merupakan spesies terpisah, yaitu primer F6 dan P4. Primer P4 juga dapat untuk identifikasi *An. sundaicus*, dengan pita DNA yang spesifik untuk OTU Jangkaran pada fragmen 1127 bp.

Berdasarkan elektroferogram, penggunaan primer P5 menghasilkan pita-pita DNA 41 macam, dengan panjang fragmen berkisar 245 bp - 4009 bp. Dari sekian banyak pita-pita DNA hasil amplifikasi, tidak dijumpai fragmen yang unik untuk sampel dari OTU Sawangan.

**Tingkat polimorfisme DNA.** Dilihat dari keaneka-ragaman genetiknya, tidak ada 2 individu pun anggota dari populasi yang sama, maupun spesies yang sama yang memiliki frekuensi ataupun keaneka-ragaman genetik yang persis sama. Perbedaan genetik antar individu tersebut terjadi antara lain dipengaruhi oleh keadaan lingkungan setempat, yang satu sama lain juga tidak pernah sama. Penanda genetik RAPD-PCR yang digunakan dalam penelitian ini di samping untuk deferensiasi spesies penuh yang berbeda, dikenal pula sebagai salah satu metoda penting yang dapat digunakan untuk analisis perbedaan keaneka-ragaman ataupun frekuensi genetik termaksud. Dilihat dari persentasenya, pola pita DNA yang menunjukkan ciri ke arah monomorfisme ataupun polimorfisme dapat dihitung berdasarkan adanya perbedaan dan persamaan dari pola pita DNA tersebut. Berdasarkan persentase pita monomorfisme dan polimorfisme pada keseluruhan sampel *An. subpictus* dari seluruh lokasi penelitian didapatkan bahwa tingkat polimorfisme DNA dari Salaman maupun Sawangan sama ingginya, yaitu 96,4%, sedangkan Congot mempunyai tingkat polimorfisme DNA yang hampir sama yaitu 96,5%. Sanden mempunyai tingkat

polimorfisme DNA yang paling rendah di antara keempat lokasi, meskipun masih tinggi, yaitu 96%. Ini menunjukkan bahwa populasi *An. subpictus* baik di Salaman, Congot, Sanden maupun yang di Sawangan sebagai populasi alami mempunyai keaneka-ragaman genetik yang sangat bervariasi. Pada populasi yang *in-breeding* seperti halnya nyamuk koloni laboratorik biasanya memiliki kecenderungan dengan variasi genetik yang lebih rendah. Menurut Passarge (1994), populasi dengan keaneka-ragaman genetik yang lebih banyak akan memiliki daya adaptasi yang lebih baik dibandingkan populasi yang relatif homogen secara genetik.

**Hasil analisis kuantitatif pita DNA hasil amplifikasi.** Dari data yang diperoleh pada Tabel 1-3, berikut ini dilakukan analisis kuantitatif berdasarkan indeks kesamaan ataupun ketidak-samaan pita-pita DNA yang muncul dari semua sampel, menggunakan program statistik *NTSys-PC*, untuk selanjutnya ditransformasikan ke dalam bentuk dendrogram dengan metode UPGMA. Hasil analisis kuantitatif dengan program *NTSys-PC* pada pita-pita DNA yang diuraikan berikut dapat saling menyokong dengan hasil analisis kualitatif pita DNA seperti diuraikan di muka (IVD1).

Hasil analisis kuantitatif pita-pita DNA dengan primer F2 yang diperoleh dari sampel *An. subpictus*, bersama pembanding *An. sundaicus*, diperoleh dendrogram yang jelas. Seluruh anggota individu terbagi menjadi dua kelompok besar, masing-masing kelompok terbagi lagi menjadi dua kelompok yang lebih kecil dalam bentuk kluster dan seterusnya. Sebagai nyamuk pembanding dapat dilihat pada dendrogram individu 1, 2 dan 3 sampel dari OTU Jangkaran, yang morfologis telah diketahui sebagai spesies terpisah *An. sundaicus*, mengelompok menjadi satu populasi tersendiri dan memisah dari kelompok *An. subpictus* sampel dari OTU lainnya dengan persentase perbedaan tinggi, yaitu lebih dari 50%, bahkan lebih dari 60%. Keadaan tersebut juga terlihat jelas dari dendrogram hasil pemeriksaan RAPD dengan primer lain seperti F4, yang menunjukkan perbedaan sebesar 50%, bahkan pada penggunaan primer F6, perbedaannya hampir 75% dan P4, lebih dari 50%.

Hasil yang lebih menarik perhatian dari pemeriksaan RAPD yaitu hasil pemeriksaan *An. subpictus* dari OTU daerah ketinggian (*inland hilly*) Sawangan. *An. subpictus* tersebut menarik setelah dibandingkan dengan sampel *An. subpictus* dari OTU lain, terutama dari daerah pantai Sanden dan Congot. Seperti terlihat pada gambaran dendrogram dengan primer F6, yang telah menunjukkan pemisahan pada kelompok individu *An. subpictus* dari OTU Sawangan dengan kelompok dari OTU lainnya.



Perbedaan tersebut juga dengan persentase yang tinggi, lebih dari 50%. Hal tersebut menunjukkan bahwa telah terjadi suatu populasi *An. subpictus* tersendiri di OTU Sawangan, yang berbeda dengan kelompok *An. subpictus* dari OTU Salaman, Sanden dan Congot.

Pada dendogram dengan primer P4, individu *An. subpictus* Sawangan 1 dan 2 memisah dari individu Sanden 2 dan 3 dengan persentase perbedaan juga tinggi, lebih dari 50%. Dendogram dengan primer P5, menunjukkan adanya keterpisahan antara 1 individu dari OTU Sawangan dengan persentase perbedaan lebih dari 50%. Meskipun hanya 1 individu yang terpisah, tetapi dengan adanya tampilan dendogram F6, dan dendogram P4, yang menunjukkan adanya keterpisahan dari 3 individu dan 2 individu yang berasal dari OTU Sawangan, maka semuanya memberikan bukti (bersama bukti dari analisis kualitatif) yang kuat bahwa di Sawangan telah terbentuk *An. subpictus* populasi tersendiri, spesies kembar.

## KESIMPULAN

Telah dilakukan kajian molekuler dengan RAPD-PCR pada *An. subpictus* dari lingkungan yang berbeda, daerah pantai, daratan maupun pegunungan di sekitar Yogyakarta. Berikut dapat ditarik beberapa kesimpulan.

Variasi genetik *An. subpictus* dari daerah ketinggian (sekitar 700 m: Sawangan) menunjukkan perbedaan nyata dengan variasi genetik *An. subpictus* dari daerah daratan (inland: Salaman) yang lebih rendah (sekitar 300 m), maupun daerah pantai (Sanden dan Congot).

Diperoleh bukti yang cukup kuat bahwa perbedaan variasi genetik antara *An. subpictus* dari daerah ketinggian dan *An. subpictus* dari daerah daratan yang lebih rendah ataupun daerah pantai tersebut di atas fatnya telah berkembang menjadi interspesifik. Perbedaan tersebut, dengan penggunaan 5 primer yang cocok, tidak hanya menunjukkan lebih dari 50%, tetapi juga dijumpai pita-pita DNA teramplifikasi yang unik/spesifik untuk spesies yang berbeda. Hasil penelitian ini memberikan bukti bahwa *An. subpictus* di sekitar Yogyakarta merupakan kompleks spesies sibling yang isomorfik.

## DAFTAR PUSTAKA

- DEPKES R.I. 1983. *Entomologi Malaria, Pedoman Pemberantasan Malaria* Jilid 10, Dep.Kes. R.I. Ditjen P3M, Jakarta.
- Grossberg, R.K., Levitan, D.R. and Cameron, B.B. 1996. Characterization of Genetic Structure and Genealogies Using RAPD-PCR Markers: A Random Primer For The Novice and Nervous, dari Ferraris, L.D., Palumbi, S.R., *Molecular Zoology, Advances, Strategies and Protocols*, John Willey and Sons, Inc., Publication, New York, 67-132.
- Hadrys, H., M. Balick and B. Scierwater. 1992. Application of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) in Molecular Ecology. *Molecular Ecology* 1: 55-63.
- Hoedjo. 1992. Bionomic Khusus *Anopheles subpictus* Mengenai Peranannya Sebagai Vektor Malaria di Jongkalang Flores; *Majalah Parasitologi Indonesia* 5 (1): 47-56.
- Hoelzel, A.R. 1994. *Molecular Genetic Analysis of Population, A Practical Approach*. JRL Press, Oxford University Press. Oxford.
- Kambhampati, S., Black, W.C. and Rai, K.S. 1992. Random Amplified Polymorphic DNA of Mosquito Species and Populations (Diptera: Culicidae): Techniques, Statistical Analysis, and Applications. *J. Med. Entomol.* 29 (6), 939-45.
- Kirnowardjo, S. 1985: Status of Malaria Vectors in Indonesia-South East Asian. *J. Trop.Med. Publ. Hlth.* 16: 129-132.
- Laihad, F.J. 1998. *Situasi Malaria di Indonesia*, dibicarakan pada Workshop NTC-M di Hotel Jayakarta, Yogyakarta.
- Passarge, E. 1994. *Color Atlas of Genetics*, Thieme, 156-160.
- Post, R.J. 1985. DNA Probes for Vector Identification. *Parasitology Today*, 1: 89-90.
- Sambrook, J., Fritschy, E.F. and Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning, A Laboratory Manual*. Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.
- Tasliah. 1999. Identifikasi Gen pi-2(t) Untuk Ketahanan Terhadap Blas Serta Karakterisasi Keragaman Genetik Plasma Nutfah Padi Menggunakan Marka STS dan RAPD. *Tesis S-2 Program Pasca Sarjana*. Institut Pertanian Bogor.